Mouse TNF-alpha Uncoated ELISA Kit

Catalog No.: RK00027UN

产品简介

本产品使用夹心 ELISA 法检测天然和重组小鼠 TNF-alpha，所推荐的试剂能适用于大多数细胞培养上清、血清和血浆样品。优化使用的试剂可以改变免疫分析的性能，对含有复杂基质的样品进行稀释优化，例如血清和血浆等，可提高其在本试验中的检测效果。

***本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。**在使用本产品之前，请务必阅读产品包装内说明书。

试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒储存在 2-8℃不超过 2 个月，如需长时间储存，请置于-20℃储存。不要使用过期的组分。

试剂	规格	货号	数量		工作浓度	试剂保存
			5 plates	10 plates		
小鼠TNF-alpha捕获抗体 Mouse TNF-alpha Capture Antibody (500×)	120 μL/支	RZ21269	1 支	2 支	1/500	最多可于 -20℃保存 12 个月
小鼠TNF-alpha检测抗体 Mouse TNF-alpha Biotin-Conjugate Antibody (500×)	120 μL/支	RZ21267	1 支	2 支	1/500	
小鼠 TNF-alpha 冻干标准品 Mouse TNF-alpha Standard Lyophilized	1000 pg/支	RM00133	10 支	20 支	15.63-1000 pg/mL	
链霉亲和素-HRP（200×） Streptavidin-HRP Concentrated (200×)	300 μL/支	RZ21268	1 支	2 支	1/200	

其他所需的试剂（套装货号：RK04587）也可单独购买

组分	规格	货号	试剂保存
包被液	1 × 20 mL	RM01756	最多可于 2-8℃保存 6 个月
封闭液	1 × 30 mL	RM01757	
标准品/样本稀释液（R1）	1 × 20 mL	RM00023	
检测抗体稀释液（R2）	1 × 12 mL	RM00024	
链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）	1 × 12 mL	RM00025	
洗涤液（20x）	1 × 30 mL	RM00026	
显色剂	1 × 12 mL	RM00027	
终止液	1 × 6 mL	RM00028	
封板膜	4 × 1pcs	RM01759	最多可于室温保存 6 个月
酶标板	1 × 96T	RM01758	

***建议使用超纯水稀释洗涤液(20×)，**

上述一些组分可以单独配制：

1. 包被液（PBS）： 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。
2. 封闭液：1% BSA, 5% sucrose in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。
3. 标准品/样本稀释液（R1）、检测抗体稀释液（R2）、链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）：1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm 过滤。
4. 洗涤液：0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4。
5. 显色剂：试剂 A（H_2O_2）和试剂 B（四甲基联苯胺）以 1：1 比例混合。
6. 终止液：1 N HCL。

实验所需的材料

1. 酶标仪，并配置主波长 450 nm，次波长 630 nm 或 570 nm。
2. 多量程单/多通道移液器及吸头。
3. 去离子水或蒸馏水。
4. 洗瓶或是自动洗板机。
5. 恒温箱。
6. 灭菌的试管或是 EP 管，用于样本或是标准蛋白的稀释。

重要提示

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同不批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
4. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
5. 相关试剂中可能存在有害物质，可能导致皮肤过敏反应，避免吸入，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
6. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存或使用中请参照标签或说明书，注意避光。
7. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用涡旋。
8. 在试剂配制及移液过程中，建议使用灭菌的耗材且注意更换，以免造成试剂污染影响最终检测结果。
9. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
10. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。

样本收集与保存

1. 细胞培养上清：

   1000 × g 离心 10 分钟，及时检测；或将样本置于-20 至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行中间的稀释，最后用标准品/样本稀释液(R1)稀释。

2. 血清：

   使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 × g 离心 10 分钟并及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。

3. 血浆：

   收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30 分钟内 1000 × g 离心 15 分钟收集样本，及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。

4. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

试剂准备

使用前将所需使用的试剂平衡至室温。如果浓缩液中有结晶析出，需要将试剂置于室温轻轻摇动，直至晶体完全溶解。

1. 捕获抗体：

①用包被液稀释捕获抗体至工作浓度，随即加入稀释后的捕获抗体 100 μL/孔至 96 孔酶标板中。用封板膜封板，并在 2-8℃下孵育过夜。

②弃去孔内液体，拍干，在每个孔中加入 200 μL 封闭液，37℃下孵育至少 1 小时。

③取出封闭好的酶标板，弃去孔内液体，拍干，用铝箔袋进行抽真空储存。

2. 标准品：

①向冻干品中加入 1 mL PBS 或标准品/样本稀释液（R1）进行复溶，轻轻混匀至少 15 min，按实验需求量取用，剩余标准品分装并保存在-20 至-70℃，避免反复冻融。

②按照标准曲线的浓度用标准品/样本稀释液（R1）进行梯度稀释（建议标准曲线使用以下浓度：1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 0 pg/mL)。稀释好的标准品在 20 分钟内使用。

3. 检测抗体：

用检测抗体稀释液（R2）稀释检测抗体至工作浓度，按照检测抗体推荐的工作浓度使用。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

4. 浓缩链霉亲和素-HRP：用链霉亲和素-HRP 稀释液（R3）将浓缩链霉亲和素-HRP 稀释至工作浓度。注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

实验步骤

为获得理想的实验结果，请注意，所需使用的试剂在使用前平衡到室温。

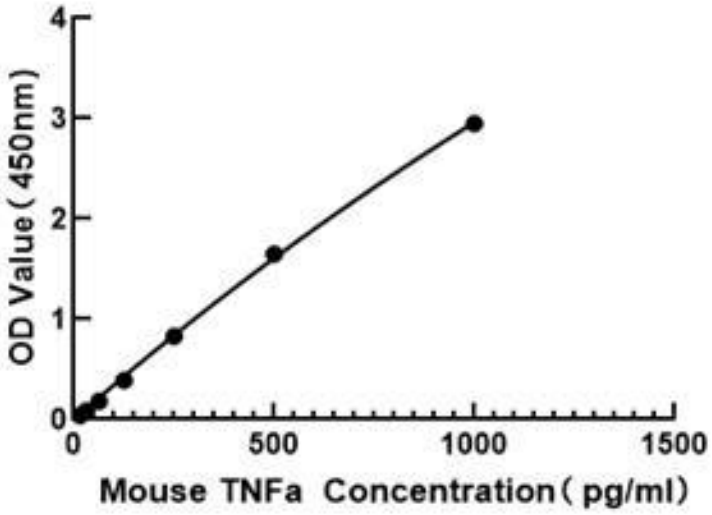
1. 提前准备好所有试剂、即用标准品、样品；使用前 15 分钟配制好检测抗体及链霉亲和素-HRP 工作液。
2. 每孔加入洗涤液 350 μL，静置 40 秒后弃去液体，该步骤共洗涤 3 次，最后一次洗完后充分拍干。
3. 在空白孔中添加 100 μL 标准品/样本稀释液（R1）。在其他孔分别加入 100 μL 不同浓度的标准品或样品，覆膜 37℃孵育 2 小时。
4. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
5. 每孔中加入检测抗体工作液（100 μL/孔），覆膜 37℃孵育 1 小时。
6. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
7. 每孔中加入链霉亲和素-HRP 工作液（100 μL/孔），覆膜 37℃孵育 30 分钟。
8. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
9. 向孔中加入显色剂（100 μL/孔）。覆膜 37℃下避光孵育 15-20 分钟。
10. 预热酶标仪。
11. 加入终止液（50 μL/孔），并立即放入酶标仪，在 5 min 内测定每个孔 450nm 的 OD 值。如果可以选择校正波长，则设置为 570 nm 或 630 nm。并从 450 nm 的读数中减去 570 nm 或 630 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

结果计算

1. 计算标准蛋白各浓度、质控、样本等复孔的平均 OD 值，每个测试的 OD 值都应减去空白孔的 OD 值以及次波长的 OD 值；
2. 使用测试获得的 OD 值绘制标准曲线，推荐使用 4-PL 拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标（Y），相应的 TNF-alpha 标准品浓度为横坐标（X），绘制标准曲线。样品的含量可根据其 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

典型数据

此标准曲线图仅供参考，计算实验结果请以实际实验数据进行。



ELISA 常见问题分析及解决方法

问题描述	可能原因	解决方法
高背景值	洗板不充分	按要求充分洗涤，保证洗板时间、次数及每孔加样量无误
	孵育条件不正确	检查孵育时间、温度是否按要求进行
	试剂、样本的交叉污染	注意实验过程中可能造成样本交叉污染的操作；配制新鲜的试剂，重复测试
无信号值或过低的信号值	试剂配制和使用错误	检查试剂配制浓度是否正确，是否按照顺序使用
	酶标仪使用、设置不正确	提前预热；设置正确的主、次波长读数
	显色时间过短	最佳显色时间应控制在 15-25 min
	终止后，未及时读数	加入终止液后，在 5 min 内读数
	样本基质效应	使用阳性质控品对照测试
过强的信号值	TMB 底物变质	检查 TMB 底物是否变蓝，使用新的底物试剂；避免使用金属物质接触底物造成变质失效
	每步实验未更换新的封板膜	每步实验更换新的封板膜
	样本中目标蛋白量过高	预测试，选择适当稀释倍数测试
重复性差	加样量不均一	检查移液器，定期校准
	样本有杂质或沉淀物	样本使用前，请离心样本
	试剂配制未充分混匀	加样前充分混匀试剂